

-

Den livsmedelshygieniska kvaliteten hos franska opastöriserade dessertostar

Karin Söderqvist

Handledare Marie-Louise Danielsson-Tham
Inst. för livsmedelshygien

Examensarbete 2003:26
Veterinärprogrammet
Veterinärmedicinska fakulteten
SLU
ISSN 1650-7045
Uppsala 2003

Abstract

This study was performed to investigate the bacteriological quality of French cheeses made from raw milk. Fifty cheeses of this type were purchased from Swedish retail premises. The methods described by the Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) were used to determine the number of *Enterobacteriaceae*, presumptive *Escherichia coli*, coagulase positive staphylococci and *Listeria monocytogenes*. In 32 cheeses (64%) the number of bacteria mentioned above exceeded the determined maximum value. Thirty samples (60%) showed high counts of *Enterobacteriaceae*. In seven samples (14%), a potentially hazardous amount of presumptive *E. coli* was found. Coagulase positive staphylococci were detected only in two samples while *L. monocytogenes* was not detected in any of the 50 raw milk cheeses. A logistic regression analysis suggested that cheeses with a high pH-value had an average higher content of analyzed bacteria than cheeses with a lower pH ($p=0,033$).

Sammanfattning

Femtio franska opastöriserade dessertostar köptes i svenska butiker och analyserades enligt NMKL-metoderna avseende *Enterobacteriaceae*, presumtiva *Escherichia coli*, koagulaspositiva stafylokocker och *Listeria monocytogenes*. Då alla analysparametrar sammanstälts bedömdes 32 av de 50 analyserade ostarna (64%) som otjänliga. 30 ostar (60%) innehöll ett för högt antal *Enterobacteriaceae*. Innehållet av presumtiva *E. coli* var för högt i sju ostar (14%). Dessa bedömdes som otjänliga och fyra stycken (8%) bedömdes som tjänliga med anmärkning avseende presumtiva *E. coli*. Två ostar (4%) bedömdes som otjänliga avseende koagulaspositiva stafylokocker. *L. monocytogenes* kunde inte påvisas i någon av de analyserade ostarna. Enligt en logistisk regressionsanalys löpte en ost med ett högre pH en statistiskt signifikant större risk att bedömas som otjänlig ($p=0,033$) än en ost med ett lägre pH.

Innehållsförteckning

Abstract/Sammanfattning	1
Inledning	3
Material och metoder	4
Inköp och transport	4
Analys	5
<i>Provberedning</i>	5
<i>pH</i>	5
<i>Enterobacteriaceae (NMKL 144:2:2000)</i>	5
<i>Termotoleranta koliforma bakterier och presumtiva Escherichia coli (NMKL 125:3:1996)</i>	6
<i>Koagulaspositiva stafylokocker (NMKL 66:3:1999)</i>	6
<i>Listeria monocytogenes (NMKL 136:2:1999)</i>	6
<i>Riktvärden</i>	7
Resultat	8
Diskussion	9
Patogena mikroorganismer i mejeriprodukter.....	9
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	11
Kontamineringsvägar.....	11
<i>Mjölkråvaran</i>	11
<i>Ostillverkningen</i>	12
<i>Lagring och distribution</i>	12
Jämförelse med andra studier.....	14
Ostburna utbrott i ursprungslandet Frankrike	15
Skillnader i bedömningen av ostar.....	15
Referenser	17

Inledning

I en pågående undersökning av svenska fäbodstillverkade färskostar, har det visat sig att en mycket hög andel av de undersökta ostarna inte höll en acceptabel livsmedelshygienisk kvalitet. Det stora flertalet var tillverkade av opastöriserad mjölk. Det vatten som användes i livsmedelsframställningen kom ofta från bäckar eller källor och bedömdes vid bakteriologisk undersökning många gånger som otjänligt (Leffler *et al.*, opublicerat).

I föreliggande examensarbete har opastöriserade franska dessertostar, inköpta i svenska butiker, undersökts avseende bakteriologisk kvalitet. Syftet har varit att undersöka de franska ostarnas livsmedelshygieniska kvalitet. I Frankrike finns en djupt rotad ostkultur och den genomsnittlige fransmannen antas konsumera mest ost i världen (anonym, 1999). År 1997 producerades över 200 000 ton ost tillverkad av opastöriserad mjölk och dessa ostar utgör ca 20% av den totala ostproduktionen i Frankrike (Bouesse, Muniesa & Pons, 1998). Majoriteten av ostarna, som ingått i studien, har varit ursprungsmärkta med AOC. Ett franskt institut, Institut National des Appellations d'Origine, utser vilka ostar som ska få denna eftertraktade AOC-stämpel. De AOC-märkta ostarna skall uppfylla bestämmelser avseende geografiskt område, betesmarker, lagring, tillverkning enligt gamla traditioner samt ostens karakteristika ("Androuet"). Det är intressant att spekulera över vad dessa regler har för betydelse för ostens livsmedelshygieniska kvalitet. I marknadsföringen av ostarna lyfts ofta begrepp som "handgjord" och "manuell" fram samt ostproducentens skicklighet som ärvt och förts vidare från generation till generation. En av ostarna har tillverkats under imponerande 1300 år (<http://www.france-gourmet.com/gb/cfm/boutique/index.cfm>, 22 oktober 2002).

Ost utgör ett bra tillväxtmedium för mikroorganismer. Detta gäller framför allt mjuka ostar med hög vattenaktivitet (Stadhouders, 1975). Mjölken produceras i en omgivning full av kontaminerande mikroorganismer och dessutom tillverkas osten inom ett temperaturintervall som gynnar tillväxten av många patogener (Tham, 1989). De olika parametrarna som i föreliggande undersökning använts för att undersöka den hygieniska kvaliteten av ostarna är *Enterobacteriaceae*, termotoleranta koliformer, presumtiva *Escherichia coli*, koagulaspositiva stafylokocker och *Listeria monocytogenes*. Dessutom har ostens pH mätts. Hela familjen *Enterobacteriaceae* används som indikator på fekal förorening. Dock kan många arter leva och föröka sig även utanför tarmkanalen och därför kan man inte med säkerhet säga att föroreningskällan utgörs av färska fekalier. Bakteriefamiljen utgör ändå en god hygienindikator. Vissa medlemmar av familjen *Enterobacteriaceae* betraktas som allvarligare än andra, bland annat presumtiva *E. coli*, *Salmonella* och *Shigella*. Närvaro av *E. coli* indikerar färsk fekal förorening då denna bakterie har svårt att leva utanför tarmen (Danielsson-Tham, 2000). *E. coli* är dessutom en välkänd patogen mikroorganism. Då intoxication orsakad av enterotoxinbildande koagulaspositiva stafylokocker är den vanligaste orsaken till matförgiftning förknippad med ost (IDF, 1980), ingår denna analysparameter. Stafylokocker härrör från primär kontaminering av mjölken eller från sekundär kontaminering, huvudsakligen från personer som hanterar osten (Tham, Hajdu &

Danielsson-Tham, 1990). *L. monocytogenes* är en välkänd sjukdomsalstrare som kan förekomma i ost. Lagringen av osten ger bakterien möjlighet att nå ett tillräckligt stort antal för att orsaka sjukdom, även om de kontaminerande bakterierna var få till antalet från början. Då *L. monocytogenes* klarar av att växa vid låga temperaturer ger kylförvaringen av osten bakterien en fördel gentemot andra, mindre kyltåliga mikroorganismer (Seeliger & Jones, 1986; Junntila, Niemelä & Hirn, 1988). *L. monocytogenes* kan förekomma hos djur med mastit, klinisk eller subklinisk. Vanligare är dock att bakterien kommer från omgivningen, till exempel från dåligt ensilage i stallet eller från golvbrunnar i mejerilokalen.

På Livsmedelsverkets webbplats finns rekommendationer om vilka livsmedel som bör undvikas av gravida kvinnor. Opastöriserad mjölk tillhör riskprodukterna liksom mjuka och halvmjuka lagrade dessertostar såsom mögelostar och kittostar, även om de är tillverkade av pastöriserad mjölk. Risken för höga halter av skadliga bakterier bedöms vara störst i periferin av osten. Gravida rekommenderas att välja vanlig hårdost och smältost eller hetta upp osten till ”bubblande het” (http://www.slv.se/templatesSLV/SLV_Page.asp?id=3762, 27 november 2002).

Material och metoder

Inköp och transport

50 franska opastöriserade dessertostar inhandlades från 4 olika butiker. De flesta av ostarna (31 stycken) införskaffades i en specialbutik där endast franska opastöriserade ostar saluförs. Några ostar (10 respektive 4 stycken) köptes från en saluhall där två delikatesshandlare erbjöd ett utbud av många olika slags ostar och dessutom kött, kaffe, bröd och liknande. Ett mindre antal (5 stycken) inköptes från en restaurang där även fisk och ost salufördes. Syftet med ostinköpen hölls så långt som möjligt hemligt men då flera av osthandlarna blev misstänksamma och frågade vad ostarna skulle användas till, fick de veta att ostarna skulle analyseras. Osthandlarna skar upp en bit av varje ost, ca 100 gram, och förpackade den separat i plastfolie eller pappersemballage. Från denna tidpunkt hanterades ostarna enbart med sterila redskap. För att inte bryta kylkedjan, transporterades ostarna i kylväska och transporttiden överskred aldrig 1,5 timma. Ostarna förvarades i kylskåp som höll 4 °C eller lägre och analyserna påbörjades inom 5 dygn. Endast en av ostarna var märkt med bäst före datum och analysen av denna skedde nästan en månad före det utsatta datumet. 30 ostar var tillverkade av komjölk, 15 stycken av getmjölk, 3 av fårmjölk och 2 ostar bestod av blandningar ko- och getmjölk respektive ko-, get- och fårmjölk. Ostarna indelades i fyra olika konsistensgrupper efter en subjektiv bedömning av författaren. Sex stycken bedömdes som hårda, 13 som halvmjuka (till exempel kittost), 20 som mjuka/kladdiga (ostar av brietypp) och 11 som mjuka/smuliga (färskosttyp).

Tabell 1. Indelning av ostarna enligt författarens subjektiva bedömning. Vid analysen har vissa ostsorтер förekommit två gånger (anges med "2" inom parentes).

Hårda: Fouchtra de Chèvre, Fouchtra de Vache (2), Morbier, Ossau-Iraty, Raclette

Halvmjuka: Bleu d'Auvergne, Bleu de Gex, Chaumes, Epoisses, Fourme d'Ambert, Fromage de Langres, Maroilles, Munster, Murol, Pavin, Pont l'Evêque, Roquefort, Vacherol

Mjuka/kladdiga: Amaltea, Arôme de Lyon, Banon de Jache, Brie de Meaux, Brie de Nangis, Briquette de Chèvre, Cabrigourmet, Cados, Camembert (2), Cour de Neufchatel, Colommiers, Cremeux du Puy, Le Villageois, Peillouté, Reblochon, Roche Baron, Saint-Marcellin, Selles sur Cher, Tourrée de l'Aubier

Mjuka/torra: Brin d'Amour, Chèvre, Crottins de Chavignol (2), Langres, Olivia, Picodon (2), Pouligny Saint Pierre, Sainte-Maure, Vendengeur

Analys

Alla redskap, vätskor och substrat som användes vid analyserna var sterila.

Provberedning

Analyserna genomfördes enligt NMKL, Nordisk Metodikkommitté för Livsmedel. Bakterier kan vara ojämnt spridda i livsmedel och i ost finns vanligen en högre koncentration av mikroorganismer på ytan än i innersta delarna av osten. Därför bör en representativ mängd provmaterial tas från både ostarnas kanter och dess inre delar. 10 gram av varje ost vägdes upp på angivet sätt och bitarna togs med steril sax och pincett. Ostbitarna lades i en steril stomacherpåse tillsammans med 90 gram spädningvätska (fysiologisk koksaltlösning med pepton). Innehållet homogeniserades i en stomacher under 30 sekunder. Därefter spädades suspensionen (1/10) i en spädningsserie. Totalt erhöles sex olika spädningkoncentrationer inklusive den ursprungliga suspensionen; 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 och 1/1 000 000. Till spädningen användes samma spädningvätska som ovan (fysiologisk koksaltlösning med pepton). Från spädningarna togs 1,0 ml med pipett till djupspridning och 0,1 ml till ytspridning.

pH

pH mättes i den stomacherade ostblandningen (spädning 1/10) med en pH-meter (inolab WTW pH level 1, tvåpunktskalibrering med pH 4 och 7).

Enterobacteriaceae (NMKL 144:2:2000)

1,0 ml av provet överfördes med pipett till en tom petriskål. Ingjutning skedde sedan med VRGG-agar (violetterött-galla-glukosagar, Difco 1866-17) och därefter övergjutning med ett tunt lager av samma agar för att alla kolonier skulle bli djupkolonier. Plattorna inkuberades i 37 °C i 24±2 timmar. Alla skära till

rödfärgade kolonier med eller utan precipitationszon räknades och fem representativa kolonier överfördes med ögla till plattor med TSA-agar (trypton-soja-agar, Oxoid CM 131) eller blodagar (Oxoid CM 55 och nötblod i natriumcitratlösning, SVA). Inkubering skedde i 37 °C under 24±3 timmar och konfirmering utfördes därpå genom att stryka ut kolonimaterial på ett filterpapper fuktat med oxidasreagens (Difco 261181). Om färgen på bakteriematerialet inte blivit mörk blåviolett inom 10 sekunder bedömdes bakterien som oxidasnegativ.

Termotoleranta koliforma bakterier och presumtiva Escherichia coli
(NMKL 125:3:1996)

Av aktuella spädningar överfördes 1,0 ml till petriskålar och ingöts i TSA (trypton-soja-agar) samt övergöts med VRG-agar (violetrött-galla-agar, Difco 0012-17-7). Inkubering skedde vid 44 °C i 24±3 timmar. Därefter räknades alla mörkröda kolonier med en diameter på över 0,5 mm med omgivande precipitationszon. Fem kolonier överfördes till förvärmade rör med LTLNB (laktos-trypton-laurylsulfatbuljong, Oxoid CM 921) med uppochnedvänt Durhamrör. LTLNB-rören inkuberades i 44 °C i 24±3 timmar. Om Durhamrörets kupol efter inkuberingen var gasfylld, kunde man sluta sig till att det rörde sig om en termotolerant koliform bakterie. Om dessutom tillförelse av Kovac's indolreagens (SVA) färgade toppskiktet i LTLNB-röret rött, rörde det sig om presumtiva *E. coli*.

Koagulaspositiva stafylokocker (NMKL 66:3:1999)

0,1 ml från aktuella spädningar racklades ut på BP-agar (Baird-Parker, Oxoid CM 275 och Oxoid SR 54). Plattorna inkuberades i 37 °C och efter 24±3 timmar överfördes 5 kolonier till blodagar som ställdes i 37 °C över natten. BP-plattorna ställdes in i inkubatorn i ytterligare ett dygn för att sedan slutavläsas. Efter ett dygn är typiska kolonier blänkande svarta eller grå med en diameter på 1,0-1,5 mm. Efter två dygn ska kolonierna ha en diameter på 1,5-2,5 mm. Kolonierna ska närmast omges av en grumlig och utanför denna en klar zon. Enligt NMKL 66:3:1999 ger koagulaspositiva stafylokocker från mjölkprodukter ofta atypiska kolonier på BP-agar. Från blodplattan överfördes kolonimaterial till rör med ospädd hästplasma (filtrerad hästplasma, SVA, genom undersökning befunnen likvärdig med kaninplasma som används i NMKL-metoden). Plasmarören inkuberades i 37 °C och avlästes efter 2, 4, 6 och 24 timmar. Om plasman koagulerade var koagulastestet positivt.

Listeria monocytogenes (NMKL 136:2:1999 med komplement till SLV FS 1998:10)

25 gram ost vägdes upp i stomacherpåse tillsammans med 225 ml förvärmad LEB1-lösning, en anrikningsbuljong (LEB: Oxoid CM 129 med tillsatsantibiotikum Oxoid L21) innehållande lika delar nalidixinsyra (Sigma N-8878) och acriflavin (Sigma A-8251), antibiotika som ska hämma tillväxten av andra, oönskade bakterier. Då *L. monocytogenes* vanligen förekommer i en avsevärt mycket högre koncentration på ostens yta (NMKL, 136:2:1999), bör en ordentlig bit av kanten tas till provberedningen. Blandningen stomacherades och därefter racklades totalt

1,0 ml av suspensionen ut på 4 olika Oxfordplattor (Oxoid CM 856 med tillsatsantibiotikum SR 206 E), det vill säga cirka 0,25 ml på varje platta till den kvantitativa analysen. Oxfordplattorna inkuberades i 37 °C och avlästes efter 24±3 timmar samt efter 48±4 timmar. Typiska konlonier är små, svarta, grå eller mörkbruna och omgivna av en svart zon. Efter 48 timmar kan en ”navel” ses i mitten av kolonien. Fem misstänkta kolonier spreds ut på blodagar som inkuberades i 37 °C i 24-28 timmar. På blodagar omges *L. monocytogenes*-kolonier av en smal, klar β-hemolyszon. LEB1-suspensionen inkuberades i 30 °C i 24±3 timmar. Därefter fördes 0,1 ml av suspensionen över till ett rör med 10 ml LEB2, en buljong som innehåller en högre koncentration acriflavin än LEB1 och därmed är mer selektiv. Den inkuberade LEB1-suspensionen ströks dessutom ut med ögla på både Oxford- och PALCAM-agar (Oxoid CM 877 med tillsatsantibiotikum SR 150 E) som inkuberades i 37 °C och avlästes efter 24±3 samt 48±4 timmar. På PALCAM-agar växer *Listeria* spp. som små grå-gröna kolonier, omgivna av en svart ring och ibland med svart centrum. Liksom på Oxford-agar, sjunker centrum av kolonierna ihop på PALCAM-agar efter 48 timmar. Då LEB2-rören hade inkuberats i 30 °C i 24±3 timmar, spreds innehåll ut med ögla på Oxford- och Palcamagar som sedan inkuberades och avlästes enligt ovan. Då ingen av ostarna i försöket innehöll några misstänkta kolonier av *L. monocytogenes*, behövde inga ytterligare tester utföras för konfirmering.

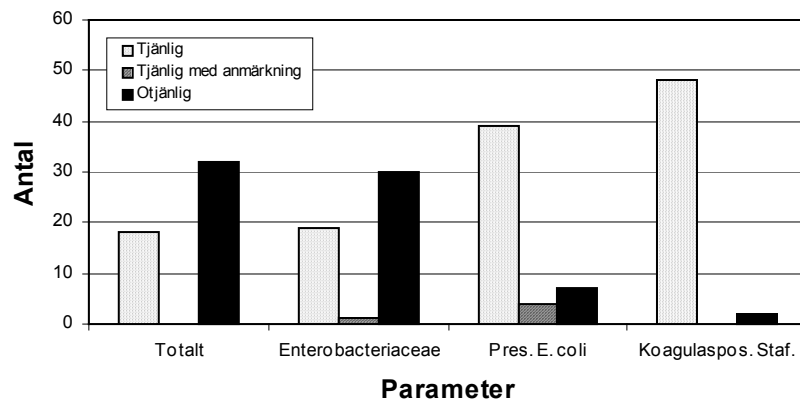
Riktvärden

Det finns inga officiella riktvärden för opastöriserade ostar. De riktvärden som använts vid bedömningen är framtagna vid institutionen för livsmedelshygien med hänsyn till att osten är en ätfärdig produkt som inte skall värmebehandlas före förtäringen. Följande log-värden av colony forming units (cfu) per gram och bedömningar användes:

<i>Enterobacteriaceae</i>	<3,0 = tjänlig 3,0-4,0 = tjänlig med anmärkning ≥4,0 = otjänlig
Presumptiva <i>Escherichia coli</i> :	<2,0 = tjänlig 2,0-3,0 = tjänlig med anmärkning ≥3,0 = otjänlig
Koagulaspositiva stafylokocker:	<2,0 = tjänlig 2,0-3,0 = tjänlig med anmärkning ≥3,0 = otjänlig
<i>Listeria monocytogenes</i> :	Om påvisad i 25 gram = otjänlig

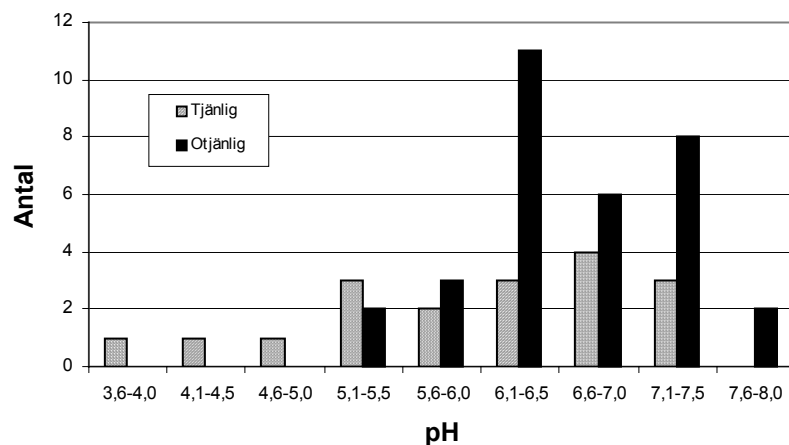
Resultat

Då alla analysparametrar sammanställts bedömdes 32 av de 50 analyserade ostarna (64%) som otjänliga. Av dessa var 8 stycken (16%) otjänliga beträffande mer än en av de analyserade parametrarna. Det är framför allt antalet *Enterobacteriaceae* som varit för högt i och med att 30 av ostarna (60%) innehöll mer än log 4,0 *Enterobacteriaceae* per gram. En ost (2%) hamnade inom intervallet tjänligt med anmärkning och de övriga bedömdes som tjänliga avseende *Enterobacteriaceae*. Elva ostar som bedömdes som otjänliga på grund av höga *Enterobacteriaceae*-tal, låg även högt i antalet presumtiva *E. coli*. Sju ostar (14%) bedömdes som otjänliga och fyra stycken (8%) bedömdes som tjänliga med anmärkning avseende presumtiva *E. coli*. Koagulaspositiva stafylokocker påvisades endast i två ostar (4%). I dessa var dock antalet så högt att ostarna bedömdes som otjänliga. *L. monocytogenes* kunde inte påvisas i någon av de analyserade ostarna.



Figur 1. Bedömning av ostarna baserad på samtliga undersökta parametrar respektive varje analysparameter för sig (*Enterobacteriaceae*, Presumptiva *Escherichia coli* och koagulaspositiva stafylokocker).

Ostarnas pH-värden sträckte sig från 3,95 till 7,82 med ett medelvärde på 6,39. Bland de otjänliga ostarna var medelvärdet högre än bland de tjänliga ostarna; 6,59 respektive 6,03. Efter en logistisk regressionsanalys (the SAS system) föreföll det finnas ett samband mellan ostens pH och dess livsmedelshygieniska kvalitet, såtillvida att en ost med ett högre pH löpte en statistiskt signifikant större risk att bedömas som otjänlig ($p=0,033$). Dessutom verkade det enligt analysen finnas ett samband mellan ostens konsistens och bakterieinnehåll. De ostar som vid författarens subjektiva bedömning placerades i gruppen mjuk/kladdig, klassades som otjänliga i större utsträckning än ostar av annan konsistens ($p=0,0037$). Bland de mjuka/kladdiga ostarna bedömdes 18 av 20 som otjänliga.



Figur 2. Ostarnas bedömning i relation till deras pH.

Diskussion

Patogena mikroorganismer i mejeriprodukter

Antalet kända patogena bakterier i mejeriprodukter har ökat under åren. För ett tjugotal år sedan bekymrade sig mikrobiologer inom mjölkindustrin inte om *Listeria monocytogenes* och de hade ännu inte hört talas om *Escherichia coli* O157 (Eyles, 1995).

Escherichia coli

E. coli är en tarmbakterie som normalt förekommer hos människa och djur men det finns stammar av *E. coli* som är patogena. Dessa indelas i fyra huvudgrupper; enteropatogena *E. coli* (EPEC), enterotoxinbildande *E. coli* (ETEC), enteroinvasiva *E. coli* (EIEC) och enterohemorragiska *E. coli* (EHEC) (Hegrestad, 2001). ETEC är den vanligaste orsaken till turistdiarré i utvecklingsländer i Afrika, Asien och Latinamerika. Smittspridningen sker fekalt-oralt och 10^6 - 10^{10} bakterier krävs för att ett tillräckligt högt antal ska klara sig förbi den sura miljön i magsäcken och bilda enterotoxiner, LT och/eller ST, i tarmen. Dessa ger upphov till sekretorisk vattentunn diarré (Iwarson & Norrby, 1995). Enterohaemorrhagiska *E. coli* (EHEC) kan ge upphov till haemorrhagisk kolit och den allvarliga komplikationen HUS, haemolytiskt uremiskt syndrom (Heuvelink *et al.*, 1998). EHEC har en låg infektionsdos. Det kan räcka med tio bakterier för att en människa ska bli sjuk (Danielsson-Tham, 1998) och detta beror troligtvis på bakteriens förmåga att tolerera lågt pH. Väl i tarmen bildar bakterien ett verotoxin som kan spridas i kroppen och orsaka intravaskulär koagulation och trombocytopeni. Särskilt njurarnas glomeruli kan drabbas hårt, speciellt hos barn

(Buchanan & Doyle, 1997). EHEC kan växa vid pH 5,4 och vid 8 °C i mjölk. Den kan överleva i mer än 60 dygn på ytor av rostfritt stål och mer än 18 veckor i jord (Danielsson-Tham, 1998). EHEC kan överleva i sura miljöer, ända ner till pH 3. Patogena stammar av *E. coli* är mer syratåliga än icke-patogena (Garren, Harrison, & Russell, 1997). I ovan beskrivna analys av franska opastöriserade ostar påvisades ett högt antal presumtiva *E. coli* i en ost med pH 5,33.

På hösten 1983 insjuknade mer än 200 personer i Stockholmsområdet efter att ha ätit fransk Brie-ost av ett visst fabrikat. Vid bakteriologisk undersökning av osten påvisades 10^6 LT-producerande *E. coli* (ETEC) per gram (Danielsson-Tham, 1989). Det första utbrottet av hemorragisk kolit beskrevs i USA 1982. *E. coli* O157:H7 är den serotyp av EHEC som sedan dess oftast kopplats samman med dessa humana sjukdomsfall. I Sverige har endast ett fåtal fall av EHEC diagnostiserats (Iwarson & Norrby, 1995). Mellan 1982 och 1997 hade över 100 utbrott av EHEC rapporterats i USA och i de utbrott där smittkällan kunde identifieras, var 52% orsakade av livsmedel som härstammade från nötkreatur, såsom kött, mjölk eller ost (WHO, 1997). Bland 47 EHEC-utbrott i Europa mellan år 1992 och 1996 där epidemiologiska detaljer kunnat erhållas, var livsmedel den troliga smittorsaken i 23 av utbrotten. I 13 utbrott var smittvägen okänd och i de övriga kunde smittan härledas till djurkontakt, överföring mellan människor och vatten. Endast i 10 av de 23 troliga livsmedelsorsakade utbrotten, trodde man sig veta vilka livsmedel det rörde sig om; kött, mjölk och ost (Ammon, 1997).

Koliformer hittas ofta i opastöriserad mjölk. Desmaures *et al.* (1997) fann koliformer i de flesta opastöriserade mjölkproven från ett område i Normandie där Camembert-ost tillverkas. Antalet koliformer varierade från <1 till $2,2 \times 10^4$ cfu per milliliter, 84% av proven innehöll <100 cfu per milliliter. Prevalensen av *E. coli* O157:H7 i mjölk varierar i olika undersökningar från 0% (603 prover; Hancock *et al.*, 1994) och upp till 10% (115 prover; Padhye & Doyle, 1991).

Staphylococcus aureus

Innehåll av *Staphylococcus aureus* i ostar tillverkade av opastöriserad mjölk är en känd hälsorisk (Tham, Hajdu & Danielsson-Tham, 1990). *S. aureus* är enligt rapporter från franska hälsomyndigheter den vanligaste patogenen i ost tillverkad av opastöriserad mjölk (De Buysse *et al.*, 2001). Stafylokokker är tåliga bakterier som kan bilda enterotoxiner i temperaturer mellan 10 och 45 °C och i pH mellan 4,0 och 9,6. Dessutom är de salttåliga och klarar miljöer med låg vattenaktivitet (Danielsson-Tham, 2000). Det är inte alla stammar av *S. aureus* som kan producera enterotoxiner men bland de stammar som har förmågan, har man identifierat sju olika typer av enterotoxin. Typ A och D de vanligaste typerna som ger intoxication hos människa. Dessa enterotoxiner bildas under bakteriernas tillväxtfas medan de andra typerna av enterotoxin huvudsakligen bildas under bakteriernas stationära fas (ICMSF, 1996). Man har inte kunnat se något enkelt samband mellan antalet bakterier och koncentrationen av enterotoxiner (Lindqvist, Sylvén & Vågsholm, 2002). *S. aureus* kan orsaka mastit hos nöt, get och får. Denna kan ha ett akut förlopp men vanligtvis rör det sig om en kronisk subklinisk mastit (Carter, Chengappa & Roberts, 1995).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes har förmågan att motstå många av de hållbarhetsbefrämjande metoder som används för att bevara livsmedel, såsom låg temperatur, låg vattenaktivitet och lågt pH. *Listeria* kan växa inom temperaturintervallet $-0,4$ till 45 °C och mellan pH 4,39 och 9,4 (ICMSF, 1996) och kan därmed konkurrera ut många mindre tåliga mikroorganismer. Därför utgör livsmedel som lagras under en lång tid, till exempel mjuk ost, en potentiell risk för tillväxt av *L. monocytogenes*. Infektionsdosen av *L. monocytogenes* är inte känd men beräknas från utbrott att vara åtminstone 10^3 cfu/g (Codex, 2001). Lagringen av osten ger *L. monocytogenes* möjligheten att nå ett tillräckligt stort antal för att orsaka sjukdom, även om det initiala innehållet är lågt. *L. monocytogenes*, särskilt i ytlagren av osten (Tham & Danielsson-Tham, 1988), kan sedan kontaminera andra produkter i omgivningen (Farber, *et al.*, 1987). Ost av olika slag har vid ett flertal tillfällen kopplats samman med utbrott av listerios. Ett stort listeriosutbrott med 142 insjuknande inträffade 1985 i Kalifornien och orsakades av färskost innehållande *L. monocytogenes*. Utbrottet krävde många dödsoffer (Linnan *et al.*, 1988) och färskosten innehöll 10^2 till 10^3 *Listeria monocytogenes* per gram (Ryser & Marth, 1987). Mellan 1983 och 1987 insjuknade 122 människor i Schweiz efter att ha konsumerat Vacherin Mont d'Or, en mjuk ost tillverkad av opastöriserad mjölk. Denna innehöll *L. monocytogenes* i antalet 10^4 per gram (Schönberg, 1988) samt orsakade 34 dödsfall (Bille, 1990). Under 1994 insjuknade i Frankrike 20 personer i listerios efter att ha ätit ost tillverkad av opastöriserad mjölk. Mortaliteten var 10% (Goulet *et al.*, 1995). Sommaren 2001 drabbades i Sverige ett hundratal människor av den gastrointestinala formen av listerios efter att ha konsumerat färskost tillverkad av opastöriserad mjölk (Carrique Mas *et al.*, 2002 och muntlig information från Danielsson-Tham).

Listeria monocytogenes kan orsaka mastit hos kor (Hyslop & Osborne 1959). Även subklinisk listeriamastit har rapporterats (Errebo-Larsen & Jensen, 1977). Idisslare kan dessutom urskilja *L. monocytogenes* i faeces (Skovgaard & Morgen, 1988). I undersökningar varierar incidensen av *L. monocytogenes* i opastöriserade mjölkprov från 0% (Lovett, Francis & Hunt, 1987) till 16% (Fenlon, Stewart & Donachie, 1995).

Kontamineringsvägar

Mjölkråvaran

Även om mjölken kommer från ett friskt juver, möts den under mjölkkningsprocessen av omgivningsbakterier. Spenar kan vara bemängda med jord och avföring och kan således kontaminera mjölken. Personen som mjölkar och hanterar mjölkkningsmaskinerna kan också bidra till ett ökat bakterieinnehåll (Tham, 1989). Psykrotrofa bakterier som *L. monocytogenes* kan sedan föröka sig i mjölktanken (Loncarevic, Danielsson-Tham & Tham, 1995).

Förekomsten av *Listeria spp.* har studerats på en skandinavisk mjölgård under ett år. *L. monocytogenes* hittades framför allt i faecesprov (20%) men även i mjölk (5%) och ensilageprover (14%). En ko hade subklinisk mastit och utsöndrade 2400

cfu *L. monocytogenes* per ml mjölk. Dåligt ensilage och otillräcklig stall- och mjölkningshygien fastställdes som riskfaktorer för kontaminering av mjölken (Waak, 2002).

Stafylokockerna kan härröra från primär kontaminering av mjölken eller från sekundär kontaminering, huvudsakligen från personer som hanterar osten (Tham, Hajdu & Danielsson-Tham, 1990). I det första fallet hjälper det att pastörisera mjölken innan ostberedningen, i det andra spelar det ingen roll om mjölken är pastöriserad eller inte (Tham, 1989).

Ostillverkningen

Efter pastöriseringen kan kontamination ske via tillsatta ingredienser, oren utrustning, manuell hantering, vattenstänk från golven, kondens och skadedjur (Terplan, 1988). Användning av mjölksyrakultur vid tillverkningen av ost ger lägre pH och försämrar miljön för patogena mikroorganismer (Tham, 1989). I en bakteriologisk undersökning utförd av Tham *et al.*, analyserades gårdsproducerad getost som indelades i grupper efter om de tillverkats av opastöriserad eller pastöriserad mjölk samt med eller utan tillsats av startkultur. Ostar som tillverkades av opastöriserad mjölk utan startkultur, utgjorde den sämsta gruppen ur livsmedelshygienisk synvinkel (Tham, Hajdu & Danielsson-Tham, 1990). Om sänkningen av pH i ostmassan går långsamt kan till exempel stafylokocker växa till och producera enterotoxiner (Tham, 1989). Ostar som tillverkats av pastöriserad mjölk är känsligare för angrepp av kontaminerande mikroorganismer då de vanligen inte innehåller ett lika stort antal konkurrerande bakterier som ost tillverkad av opastöriserad mjölk. För att motverka detta tillsätts därför ofta så kallade startkulturer. Ju fler hanteringssteg osten går igenom, desto större risk att den ska kontamineras. Särskilt utsatta är ostar som har hög vattenhalt (De Buyser *et al.*, 2001).

Många ostar läggs i saltlake där det har visats att *L. monocytogenes* kan överleva i 259 dagar (Larson, Johnson & Nelson, 1999). Även *Salmonella* Typhimurium och *E. coli* O157:H7 har visats kunna överleva i saltlake i åtminstone 5 veckor (Ingham, Su & Spangenberg, 2000).

L. monocytogenes isoleras ofta från golvbrunnar i mejerianläggningar (Cox *et al.*, 1989). Det är förmodligen fukten som bidrar till en lämplig miljö åt bakterien. Det har visats att *L. monocytogenes* kan fästa till ytor av rostfritt stål, gummi, glas och polypropylen (Mafu *et al.*, 1990) och att bakterien där kan växa som en biofilm (Blackman & Frank, 1996). *L. monocytogenes* har visats kunna överleva i en livsmedelsanläggning i minst sju år. Troligen blir den en del av mejeriets naturliga bakterieflora (Unnerstad *et al.*, 1996). Det är extremt svårt att utrota bakterien när den väl har etablerat sig i livsmedelslokalen (Seeliger, 1987).

Lagring och distribution

När det gäller mjuk ost uppger Farber och Peterkin (1991) att kontamineringen av *L. monocytogenes* nästan uteslutande finns på ostens yta. I en undersökning analyserades prover dels från ytan och dels från centrum av tre mjuka ostar.

Antalet *L. monocytogenes* var högre på ytan än i ostens inre delar i samtliga fall, antalet kunde skilja på upp till log 3,8. Även ytans pH var högre än det som uppmättes i ostens centrum (Danielsson-Tham *et al.*, 1993). pH höjs under lagringen av ytmognade ostar vilket ger en bättre miljö för tillväxt av mikroorganismer, däribland *L. monocytogenes*. Lagringshyllor utgör således en riskfaktor (Waak, 2002). I färskostarna som orsakade ett svenskt utbrott av gastrointestinal listerios sommaren 2001, kunde ett stort antal *L. monocytogenes* påvisas både i ostarnas centrala och perifera delar. Man fann i den aktuella besättningen en get med subklinisk listeriamastit som urskiljde *L. monocytogenes* med mjölken. Bakterien spreds under tillverkningen i hela ostmassan (Carrique Mas *et al.*, 2002 och muntlig information från Danielsson-Tham).

All hantering som delning, paketering och distribution av ostarna kan bidra till kontaminering. Efter hanteringen kan även ostar tillverkade av pastöriserad mjölk utgöra riskprodukter. I butiken är det viktigt att man följer rekommendationerna gällande förvaringstemperatur och att kontamination undviks, till exempel genom att byta knivar mellan olika ostsorter (Loncarevic, 1998). I en undersökning avseende förekomst av *L. monocytogenes* i ostar inköpta på den svenska marknaden 1989-93, visade det sig inte ha någon betydelse om ostarna i studien var hela vid inköpen eller delade i bitar. Incidensen av *L. monocytogenes* var densamma i båda grupperna. Kontaminering mellan ostarna i disken verkar därför inte vara av någon stor betydelse enligt denna undersökning (Loncarevic, Danielsson-Tham & Tham, 1995).

I vissa länder är det brukligt att lagra ostar tillverkade av opastöriserad mjölk i åtminstone 50 dagar (Kapture, 1982) eller 60 dagar (Brodsky, 1984; Nelson, 1988) innan konsumtion för att försäkra sig om att de patogena mikroorganismerna dött. Dock visar undersökningar att denna lagring inte är effektiv beträffande *Salmonella* och *L. monocytogenes* (Marth, 1986). Ost tillverkad av opastöriserad mjölk, inokulerades i ett försök med *L. monocytogenes* i samband med tillsatsen av syrakulturen under ystningen. Den färdiga osten följdes sedan under lagringstiden för att undersöka hur länge *L. monocytogenes* kunde påvisas. Som längst kunde *L. monocytogenes* påvisas i 18 veckor vilket gör att bakterien kan finnas kvar efter den normala lagringstiden (2-3 månader) (Tham, 1988).

Inte heller *E. coli* O157:H7 dör under lagringen. I ett försök av Maher *et al.* (2001), studerades tillväxten och överlevnaden av *E. coli* O157:H7 under tillverkningen och mognaden av kittost från opastöriserad mjölk. Mjölken inokulerades med *E. coli* O157:H7 i ett antal av 34 ± 2 cfu per ml och antalet steg dramatiskt vid temperaturstegringen från 32 till 37 °C under tillverkningen men minskade sedan då temperaturen och pH sjönk. Ökningen av antalet bakterier under själva tillverkningen, antogs dels ha skett på grund av ”physical entrapment” av bakterierna i ostmassan. Detta kan motsvara en ökning på ungefär 10 gånger (Ryser & Marth, 1989). Under mognadslagringen minskade antalet *E. coli* O157:H7 på ytan i snabbare takt än inne i osten. Två veckor efter tillverkningen skulle ostarna ha kommit ut på marknaden och vid denna tidpunkt fanns det fortfarande ett tillräckligt stort antal *E. coli* O157:H7 i osten för att kunna orsaka sjukdom hos människa. Ett lågt antal kunde påvisas i prover från ostens yta ända upp till 90 dagar efter tillverkningen (Maher *et al.*, 2001).

Några författare hävdar att antalet koagulaspositiva stafylokocker minskar i osten efter några veckors mognad (Roughley & McLeod, 1961; Bryan, 1983) men resultaten från en undersökning av Tham *et al.* (1990) stödde inte denna teori. Dessutom innebär ett resultat som visar att osten är fri från koagulaspositiva stafylokocker inte någon garanti för att osten är fri från enterotoxin.

I en undersökning inokulerades opastöriserad getmjölk med *Staphylococcus aureus* i olika koncentrationer (10^2 - 10^6 cfu per ml). Av mjölken tillverkades sedan ost av Camemberttyp. Därefter studerades *S. aureus* förmåga att överleva och tillväxa i osten samt produktionen av enterotoxin. Under själva framställningen av osten, skedde en påtaglig tillväxt av *S. aureus* vilket visar att förutsättningarna vid ystningen är goda för bakteriens tillväxt avseende temperatur och pH. Efter tillsatsen av salt stabiliserades antalet *S. aureus* eller minskade något. Enterotoxin A kunde bara påvisas i ostar där antalet *S. aureus* hade uppnått mer än 10^6 per gram. Den enda gruppen där denna nivå inte uppnåddes var den där mjölken under tillverkningen hade inokulerats med 10^2 cfu per gram. I dessa ostar kunde således heller inget enterotoxin påvisas. Antalet *S. aureus* i ostarna höll sig på en stabil nivå under lagringen och visade inga tendenser till att minska då den sista analysen utfördes, 41 dagar efter tillverkningen (Meyrand *et al.*, 1998).

Jämförelse med andra studier

I en belgisk studie (De Reu *et al.*, 2002), undersöktes innehållet av olika patogena matförgiftningsbakterier i 71 ostar tillverkade av opastöriserad mjölk. I möjligaste mån användes gränsvärden fastställda i Mjölkdirektivet 92/46/EEC. De riktvärden som användes i föreliggande undersökning och som tagits fram vid institutionen för livsmedelshygien är generellt strängare än dem som användes i den belgiska undersökningen. Om resultaten från den belgiska studien bedöms enligt riktvärdena från institutionen för livsmedelshygien, får man följande bedömning. 39 av 71 ostar (55%) innehöll ett för stort antal koliformer och 20 av 71 (28%) ett för stort antal *E. coli* i den belgiska studien jämfört med 60% respektive 14% i föreliggande studie. I det belgiska försöket testades alla ostar som innehöll mer än 10^3 cfu per gram av *S. aureus* på förekomst av enterotoxin. Fjorton ostar (20%) testades varav en visade sig innehålla två typer av enterotoxin, typ A och C (<0,05 ng/g). Koncentrationen av respektive enterotoxin var dock mycket lägre än den dos som behövs för att ge kliniska symptom hos människa. Övriga enterotoxintester gav negativt resultat. Endast två ostar (4%) från examensarbetet innehöll mer än 10^3 *S. aureus* cfu per gram. Färskost, blåmögelostar, halvhårda och hårda ostar hade i medeltal ett lägre antal *E. coli* och *S. aureus* än de mjuka ostarna i den belgiska studien. Anledningen ansågs vara ett högt pH, en kort mognadsperiod, en hög vattenaktivitet och en lägre saltkoncentration i de mjukare ostarna. *L. monocytogenes* påvisades i två ostar (2,8%) i det belgiska försöket medan denna bakterie inte alls påvisades i föreliggande undersökning. I den belgiska studien kunde däremot inte *L. monocytogenes* påvisas vid en senare analys, vilket indikerade att bakterien förekommit mycket sparsamt eller endast i en liten del av osten eller att bakterierna dött på grund av konkurrerande bakterieflora. I andra undersökningar varierar prevalensen av *L. monocytogenes* i opastöriserade franska

ostar från 4,4% (Rudolf & Scherer, 2001) till 43% (Loncarevic, Danielsson-Tham & Tham, 1995). Ytterligare analyser i den belgiska undersökningen, visade att fyra av 71 ostar (5,6%) innehöll *E. coli* O157. Då tre av dessa köptes från samma försäljningsställe kunde kontaminering mellan de olika ostarna inte uteslutas. I en större undersökning (Coia *et al.*, 2001) kunde *E. coli* O157 inte påvisas i någon av de 739 ostar, tillverkade av opastöriserad mjölk, som analyserades. I den belgiska studien kunde *Salmonella* inte påvisas (De Reu *et al.*, 2002). I en annan undersökning av 2350 opastöriserade ostar utförd av French Ministry of Agriculture mellan 1995 och 1997, visade sig endast fyra ostar innehålla *Salmonella*.

Ostburna utbrott i ursprungslandet Frankrike

Sedan det på 1980-talet blev känt att *Listeria* spreds via föda och att mjölkprodukter var inblandade i flera av epidemierna, har stora insatser gjorts inom mejerisektorn och myndigheterna i Frankrike för att minska risken för utbrott. Bland annat har det skett genom introduktion av HACCP. Dessutom har EU direktivet 92/46 om mjölkhygien trätt i kraft och ett av dess syften är att främja livsmedelssäkerheten. I en fransk studie beskrivs tio dokumenterade matförgiftningsutbrott i Frankrike mellan 1980 till 1997 som kunnat härledas till mjölk eller mjölkprodukter. Samtliga tio utbrott hade kopplats ihop med ost eller färskost ("farm fromage frais") som tillverkats av opastöriserad mjölk. Fem av utbrotten orsakades av *Salmonella* (Dublin, Paratyphi B och Typhimurium), två av *L. monocytogenes*, två av *E. coli* (EHEC-färskost) och ett av *S. aureus*. I det sistnämnda utbrottet kunde man visa att det var osttillverkaren som kontaminerat ostarna då man isolerade exakt samma bakteriestam av *S. aureus* från både osten och huden respektive näsan på ostproducenten. Bland inrapporteringar från lokala hälsomyndigheter i Frankrike mellan 1992-1997 finns 69 utbrott där smittan spårats till mjölk- eller mejeriprodukter. 53 av dessa rörde ost varav 25 tillverkade av opastöriserad och 28 av ospecificerad mjölk. Sju utbrott kopplades till färskost, fem tillverkade av opastöriserad och två av ospecificerad mjölk. Bland de 53 ostutbrotten konstaterades *S. aureus* vara smittagens i 47 av fallen, bland färskosten var motsvarande andel sex av sju. Fem utbrott orsakades av *Salmonella* och två av *E. coli*. Då inrapporteringarna är frivilliga, finns anledning att misstänka kraftig underrapportering (De Buyser *et al.*, 2001).

Skillnader i bedömningen av ostar

Livsmedelsverket har gett ut en vägledning för mikrobiologisk bedömning av prov som tas ut i den offentliga livsmedelskontrollen. De värden som anges för tjänligt med anmärkning eller otjänligt grundar sig på erfarenhet av nivåer som kan accepteras med hänsyn till omsorgen om konsumenternas säkerhet och livsmedlets sundhet. Värdena är inte formellt bindande gränsvärden utan fungerar som en vägledning. Bedömningsnivån otjänligt anger det antal mikroorganismer som kan medföra en hälsorisk vid förtäring av livsmedlet. Bedömningen otjänligt kan utgöra underlag för att belägga partiet med saluförbud. En produkt som bedöms tjänligt med anmärkning, har ett för högt antal mikroorganismer utan att någon

hälsorisk bedöms föreligga. Det rör sig i flertalet fall om indikatorbakterier och kan leda fram till krav på förbättrande åtgärder i tillverkningsprocessen eller hanteringen. Bedömningen tjänligt med anmärkning kan dock i normalfallet inte läggas till grund för saluförbud. För indikatorbakterierna *Enterobacteriaceae* och presumtiva *E. coli* finns endast värden för tjänligt med anmärkning i Livsmedelsverkets vägledning för mognadslagrad ost. Om antalet *Enterobacteriaceae* överstiger log 3 per gram eller presumtiva *E. coli* ligger över log 2 per gram, blir bedömningen tjänligt med anmärkning. Samma värden gäller för bedömningen tjänligt med anmärkning i institutionens för livsmedelshygien riktvärden. Skillnaden ligger i att institutionen för livsmedelshygien dessutom anger en nivå för otjänligt vid log 4 respektive log 3. Följaktligen skulle flertalet av ostarna som i föreliggande examensarbete bedömts otjänliga, bedömas som tjänliga med anmärkning om Livsmedelsverkets vägledande riktvärden skulle användas. Detta får som följd att endast två av de tidigare 32 otjänliga ostarna i examensarbetet skulle få ha kvar denna ”starkaste” bedömning. Dessa två ostar bedöms som otjänliga på grund av ett för högt antal koagulaspositiva stafylokocker enligt både Livsmedelsverket och institutionen för livsmedelshygien då riktvärdena överensstämmer (<http://www.slv.se/upload/dokument/fou/Bi/Mikrobiologiskbedomning.pdf>, 5 december 2002).

Institutionen för livsmedelshygien har arbetat fram sina ”strängare” riktvärden av hänsyn till ett flertal faktorer. Det är känt att familjen *Enterobacteriaceae* innehåller fler matförgiftningsbakterier än *E. coli*. Bland annat kan koliformer ta upp LT-bildande plasmider från andra bakteriearter. LT är värmelabila enterotoxiner och LT-produktion har påvisats hos arter inom *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Enterobacter* och *Salmonella* (Wadström *et al.*, 1976; Schoub *et al.*, 1977 och muntlig information från Danielsson-Tham). Beträffande EHEC har det visats att vissa subtyper inte växer vid 44°C som är den gällande inkubationstemperaturen i analysmetoden avseende presumtiva *E. coli*. Dessa kan alltså inte påvisas med rådande analysmetod (muntlig information från Danielsson-Tham). Institutionen har dessutom tagit hänsyn till den låga infektionsdosen för EHEC. Som tidigare nämnts räcker det att få i sig tio bakterier för att riskera att bli sjuk. En annan aspekt är att bakterierna inte är jämnt fördelade i livsmedlet. Har man otur, äter man den del som innehåller den högsta koncentrationen av skadliga mikroorganismer. Kanske har livsmedlet bedömts tjänligt på grund av att provmaterialet av en slump tagits från ostens mest hygieniska delar. Det finns även skillnader i olika individers tolerans mot patogena mikroorganismer. Som bekant drabbas vanligen barn, äldre och immunsupprimerade hårdast. Det är därmed viktigt att ha tillräckliga säkerhetsmarginaler vid bedömningen av livsmedel.

Referenser

- Ammon, A. 1997. Surveillance of enterohaemorrhagic E. Coli (EHEC) infections and haemolytic uraemic syndrome (HUS) in Europe. *Eurosurveillance* 2 (12), 91-95.
- Androuet, Ostguiden. Androuet Maître Fromager Paris i samarbete med Operakällaren
- Anonym. 1999. The world dairy situation. *International Dairy Federation/Bulletin* 339, 58.
- Bille, J. 1990. Eds. Miller, A.J., Smith, J. & Somkuti, G.A. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne Listeriosis*. Elsevier, Amsterdam, 71-74.
- Blackman, I.C. & Frank, J.F. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection* 59, 827-831.
- Bousse, M., Muniesa, L. & Pons, B. 1998. 200 000 tonnes de fromages au lait cru: qui l'eût cru? *Agriste-primeur no. 46*, 4 pp.
- Brodsky, M.H. 1984. Evaluation of the bacteriological health risk of 60-day aged raw milk cheddar cheese. *Journal of Food Protection* 47, 530-531.
- Bryan, F.L. 1983. Epidemiology of milk-borne diseases. *Journal of Food Protection* 46, 637-649.
- Buchanan, R.L. & Doyle, M.P. 1997. Foodborne disease significance of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technology* 51, 69-76.
- Carrique Mas, J., Hökeberg, I., Andersson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-Tham, M-L., Osterman, B., Leffler, M., Steen, M., Eriksson, E., Hedin, G. & Giesecke, J. 2002. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – An outbreak of listeriosis? Accepted for publication by *Epidemiology and Infection*.
- Carter, G.R., Chengappa, M.M. & Roberts, A.W. 1995. *Essentials of Veterinary Microbiology*. Fifth edition. Williams & Wilkins. 115-120.
- Codex alimentarius commission. 2001. Proposed draft guidelines for the control of *Listeria monocytogenes* in foods. ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh34/fh01_06e.pdf.
- Coia, J.E., Johnston, Y., Steers, N.J. & Hanson, M.F. 2001. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. *International Journal of Food Microbiology* 66, 63-69.
- Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R. & Siebenga, A. 1989. *Listeria spp.* In food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* 6, 49-61.
- Danielsson-Tham, M-L. 1989. *Escherichia coli* och *Aeromonas hydrophila* som matförgiftningsagens. *Vår föda* 9-10, 440-445.
- Danielsson-Tham, M-L. 1998. Vad är EHEC? *Kungliga Skogs- o Lantbruksakademiens Tidskrift* 137, 9-14.
- Danielsson-Tham, M-L (redaktör). 2000. *Kompendium i livsmedelshygien, del 1*. Institutionen för livsmedelshygien, Veterinärmedicinska fakulteten, SLU.
- Danielsson-Tham, M-L., Bille, J., Brosch, R., Buchrieser, C., Persson, K., Rocourt, J., Schwarzkopf, A., Tham, W. & Ursing, J. 1993. Characterization of *Listeria* strains isolated from soft cheese. *International Journal of Food Microbiology* 18, 161-166.
- De Buyser, M-L., Dufour, B., Maire, M. & Lafarge, V. 2001. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 67, 1-17.
- De Reu, K., Debeuckelaere, W., Botteldoorn, N., De Block, J. & Herman, L. 2002. Hygienic parameters, toxins and pathogen occurrence in raw milk cheeses. *Journal of Food Safety* 22, 183-196.
- Desmasures, N., Bazin, F. & Guéguen, M. 1997. Microbiological composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology* 83, 53-58.
- Errebo-Larsen, H. & Jensen, J. 1977. Occurrence of bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes*. *Proc. VII Int. Sym. On Listeriosis*. Ed. Ivanov, I. National Agroindustrial Union, Center for Scientific Information, Sofia. 211-219.
- Eyles, M.J. 1995. Trends in foodborne disease and implications for the dairy industry. *The Australian Journal of Dairy Technology* 50, 10-14.

- Farber, J.M., Johnston, M.A., Purvis, U. & Louit, A. 1987. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria spp.* *International Journal of Food Microbiology* 5, 157-163.
- Farber, J.M. & Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiological Reviews* 55, 476-511.
- Fenlon, D.R., Stewart, T. & Donachie, W. 1995. The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. *Letters in Applied Microbiology* 20, 57-60.
- France Gourmet. 2002-10-22. *Real French cheese*. <http://www.france-gourmet.com/gb/cfm/boutique/index.cfm>.
- Garren, D.M., Harrison, M.A. & Russell, S.M. 1997. Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates. *Journal of Food Protection* 60, 1478-1482.
- Goulet, V., Jacquet, C., Vaillant, V., Rebière, I., Mouret, E., Lorente, C., Mailot, E., Stainer, F. & Rocourt, J. 1995. Listeriosis from consumption of raw-milk cheese. *Lancet* 345, 1581-1582.
- Hancock, D.D., Besser, T.E., Kinsel, M.L., Tarr, P.I., Rice, D.H. & Paros, M.G. 1994. The prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy and beef cattle in Washington State. *Epidemiology and Infection* 113, 199-207.
- Hegrestad, A-L. 2001. EHEC - ett livsmedelshygieniskt gissel. *Svensk Veterinärtidning* 53, 619-625.
- Heuvelink, A.E., Bleuminck, B., van den Biggelaar, F.L., Te Giffel, M.C., Beumer, R.R. & de Boer, E. 1998. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands. *Journal of Food Protection* 61, 1597-1601.
- Hyslop, N.S.T.G. & Osborne, A.D. 1959. Listeriosis: a potential danger to public health. *The Veterinary Record* 71, 1082-1091.
- ICMSF. 1996. *Microorganisms in Foods 5: Characteristics of microbial pathogens*. Blackie Academic & Professional.
- IDF (International Dairy Federation). 1980. Behaviour of pathogens in cheese. *Bulletin* 122.
- Ingham, S.C., Su, Y-C. & Spangenberg, D.S. 2000. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese brines. *International Journal of Food Microbiology* 61, 73-79.
- Iwarson, S. & Norrby, R. 1995. *Infektionsmedicin, epidemiologi, klinik och terapi*. Säve Förlag, Göteborg. 302-304.
- Junttila, J. R., Niemelä, S. I. & Hirn, J. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-hemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology* 65, 321-327.
- Kapture, J. 1982. Facilities and regulations for dairy goat milk production. *Proc. Third International Conference on Goat Production and Disease*, College of Agriculture, the University of Arizona, Tucson, Arizona. 243-245.
- Larson, A.E., Johnson, E.A. & Nelson, J.H. 1999. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science* 82, 1860-1868.
- Lindqvist, R., Sylvén, S. & Vågsholm, I. 2002. Quantitative microbial risk assessment exemplified by *Staphylococcus aureus* in unripened cheese made from raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 78, 155-170.
- Linnan, M., Mascola, L., Lou, X.D., Goulet, V., May, S., Salminen, C., Hird, D.W., Yonkura, M.L., Hayes, P., Weaver, R., Audrurier, A., Plikaytis, B.D., Fannin, S.L., Kleks, A. & Broome, C.V. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319, 823-828.
- Livsmedelsverket. 2002-10-01. *Vägledning för mikrobiologisk bedömning av livsmedelsprov*. <http://www.slv.se/upload/dokument/fou/Bi/Mikrobiologiskbedoming.pdf>.
- Livsmedelsverket. 2002-11-27. *Råd och rekommendationer för gravida*. http://www.slv.se/templates/SLV/SLV_Page.asp?id=3762.
- Loncarevic, S. 1998. *Listeria monocytogenes* with Special Reference to Food Products and Human Listeriosis. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M-L. & Tham, W. 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *International Journal of Food Microbiology* 26, 245-250.

- Lovett, J., Francis, D.W. & Hunt, J.M. 1987, *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *Journal of Food Protection* 50, 188-192.
- Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J. & Magny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection* 53, 742-746.
- Maher, M.M., Jordan, K.N., Upton, M.E. & Coffey, A. 2001. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *Journal of Applied Microbiology* 90, 201-207.
- Marth, E.H. 1986. *Listeria* seminar: Marth Discusses perspectives of *Listeria* in dairy foods. *The Cheese Reporter* 111 no. 15, 1, 9 & 12.
- Meyrand, A., Boutrand-Loei, S., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Gaspard, C.E., Jaubert, G., Perrin, G., Lapeyre, C. & Vernozy-Rozand, C. 1998. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. *Journal of Applied Microbiology* 85, 537-544.
- Nelson, J. 1988. Should pasteurization of milk for cheesemaking be mandatory? *Journal of Food Protection* 51, 826.
- Padhye, N.V. & Doyle, M.P. 1991. Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 2693-2698.
- Roughly, R.J. & McLeod, R.W. 1961. Longevity of *Staphylococcus aureus* in Australian cheddar cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology* 16, 110-112.
- Rudolf, M. & Scherer, S. 2001. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology* 63, 91-98.
- Ryser, E.T. & Marth, E.H. 1987. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese; personal communication from Ajello, G.W. *Journal of Food Protection* 50, 7-13.
- Ryser, E.T. & Marth, E.H. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Brick cheese. *Journal of Dairy science* 72, 838-853.
- Schoub, B.D., Greef, A.S., Lecatsas, G., Prozesky, O.W., Hay, I.T., Prinsloo, J.G. & Ballard, R.C. 1977. A microbiological investigation of acute summer gastroenteritis in Black South African Infants. *Journal of Hygiene* 78, 377.
- Schönberg, A. 1988. Zur aktuellen Situation der Listeriose – Übersicht. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 101, 82-84.
- Seeliger, H.P.R. 1987. Listeriose – aktuell. *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 112, 359-361.
- Seeliger, H.P.R. & Jones, D. 1986. Eds. Sneath, P.H.A, Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 2. Williams & Wilkins, Baltimore. 1235-1245.
- Skovgaard, N. & Morgen, C-A. 1988. Detection of *Listeria spp.* in feces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *International Journal of Food Microbiology* 6, 229-242.
- Stadhouders, J. 1975. Microbes in milk and dairy products. An ecological approach. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 29, 104-126.
- Terplan, G. 1988. *Listeria* in the dairy industry – situation and problems in the Federal Republic of Germany. *Proc. Symp. Foodborne Listeriosis*, Wiesbaden, FRG, Sept. 7, 1988. B. Behr's Verlag GmbH&Co., Hamburg, 52-70.
- Tham, W. 1988. Survival of *Listeria Monocytogenes* in Cheese Made of Unpasteurized Goat Milk. *Acta veterinaria Scandinavica* 29, 165-172.
- Tham, W. A. 1989. *Public Health Aspects of On-Farm Manufactured Cheese*. A Bacteriological Study of Goat Cheese. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Tham, W.A. & Danielsson-Tham, M-L. 1988. *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *The Veterinary Record* 122, 540.
- Tham, W. A., Hajdu, L. J. & Danielsson-Tham, M-L V. 1990. Bacteriological quality of on-farm manufactured goat cheese. *Epidemiology and Infection* 104, 87-100.
- Unnerstad, H., Bannerman, E., Bille, J., Danielsson-Tham, M-L., Waak, E. & Tham, W. 1996. Prolonged contamination of a dairy with *Listeria monocytogenes*. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 50, 493-499.

- Waak, E. 2002. *Listeria monocytogenes* – Farm and Dairy Studies. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Wadström, T., Aust Kettis, A., Habte, D., Holmgren, J., Meeuwisse, G., Möllby, R. & Söderlind, O. 1976. Enterotoxin producing bacteria and parasites in stools of Ethiopian children with diarrhoeal disease. *Archives of Disease in Childhood* 51, 865.
- WHO. 1997. Consultation on the Prevention and Control of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Infections. Geneva, Switzerland, 28 april-1 may (WHO/FSF/FOS/97.6).